Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

“Sistema lipossomal de ftalocianina de cloro-alumínio,
contendo ácido fólico, aplicada à Terapia Fotodinâmica”.

Camila Vizentini Silva

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do
título de Mestre em Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO -SP

2013

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

“Sistema lipossomal de ftalocianina de cloro-alumínio,
contendo ácido fólico, aplicada à Terapia Fotodinâmica”.

Camila Vizentini Silva

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do
título de Mestre em Ciências, Área: **Química**

Orientador: Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco

RIBEIRÃO PRETO -SP

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Camila Vizentini

Sistema lipossomal de ftalocianina de cloro-alumínio, contendo ácido fólico, aplicada à Terapia Fotodinâmica. Ribeirão Preto, 2013.

52 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química.

Orientador: Tedesco, Antonio Claudio.

1. Terapia Fotodinâmica. 2. Lipossoma. 3. Ácido Fólico. 4. Ftalocianina de cloro-alumínio.

À minha amada e dedicada mãe.

À todos que acreditam e torcem por mim.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela minha vida e saúde. “Porque dEle, por Ele, e para Ele, são todas as coisas; glória, pois, a Ele eternamente.” (Romanos 11:36)

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco, pela oportunidade de aprendizado e crescimento, pela confiança e dedicação ao longo dos anos.

À minha mãe, Francisca, por seu amor incondicional e sem limites; por toda atenção, afeto e suporte sem os quais eu jamais teria conseguido chegar até aqui.

Ao meu pai, João Carlos, pelo amor e carinho, que mesmo longe fisicamente, estava sempre presente em meu coração.

Às minhas irmãs, Flávia e Mirela, por me ensinarem a compartilhar, por caminharem ao meu lado nos momentos difíceis e por fazerem da minha família a melhor do mundo.

Ao meu amor, amigo, companheiro e namorado, Weverton, por me ajudar a superar os desafios e tornar os meus dias mais felizes e à sua família pelo apoio e carinho.

À toda a minha família, por serem meu alicerce e meu porto seguro. Pelos incentivos, mensagens de amor e fé e pelos almoços de domingo que me davam força para continuar.

Aos amigos do Laboratório de Fotobiologia e Fotomedicina, mesmo os que não fazem mais parte do grupo, pelo dia-a-dia de trabalho e descontração e por partilharem seus conhecimentos. Em especial às amigas Dani, Gi e Paty Goto pela paciência, ensinamentos e companheirismo.

Aos amigos de Ribeirão, por compartilharem comigo maus e ótimos momentos dos melhores anos da minha vida. Em especial às queridas e divertidas Bulma, Gorda, Daninha e Bruna.

Aos amigos de Catanduva, pela amizade duradoura e sincera e por tornarem meus finais de semana alegres e inusitados.

À Prof. Dra. Paula Rahal e à todos do Laboratório de Estudos Genômicos, em especial à Marília pela atenção e colaboração.

À Universidade de São Paulo e aos docentes e funcionários da FFCLRP-USP.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

*“Transportai um punhado de terra todos os dias
e fareis uma montanha.”*

Confúcio

RESUMO

Vizentini-Silva, C. **Sistema lipossomal de ftalocianina de cloro-alumínio, contendo ácido fólico, aplicada à Terapia Fotodinâmica**. 2013. 52 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é um tratamento usado principalmente na terapia anticâncer e que depende da retenção de um composto fotossensibilizante nas células tumorais e posterior irradiação dessas células com luz visível. Após ativação, o fármaco pode gerar espécies reativas de oxigênio (EROs), como o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e radicais ($\bullet\text{O}_2^-$, $\bullet\text{OH}$), que são capazes de danificar membranas, DNA e outras estruturas celulares, induzindo a apoptose ou necrose das células tumorais. O ácido fólico, por ser super expressado na superfície das células de alguns tipos de cânceres (principalmente os ginecológicos), pode desempenhar o papel de vetorizador, tornando-se um importante aliado aos sistemas de liberação de fármacos. Neste trabalho foi avaliado o uso de ácido fólico como aditivo aos lipossomas contendo ftalocianina de cloro-alumínio como fármaco fotossensibilizante, aplicados em TFD com células MCF7. Os estudos demonstraram que os sistemas lipossomais desenvolvidos apresentam tamanho nanométrico (menor que 200 nm) e possuem biocompatibilidade quando avaliados em cultura celular de monocamada. Além disso, foi possível observar o efeito fototóxico satisfatório das formulações e o aumento da internalização do fármaco, quando utilizado o ácido fólico como vetorizador.

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica, lipossoma, ftalocianina de cloro-alumínio, ácido fólico, células MCF7.

ABSTRACT

Vizentini-Silva, C. **Sistema lipossomal de ftalocianina de cloro-alumínio, contendo ácido fólico, aplicada à Terapia Fotodinâmica**. 2013. 52 f. Dissertation (Master). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Photodynamic Therapy (PDT) is mainly used in anticancer therapy. The efficiency of this treatment is dependent on retention of photosensitizer compound at the tumor cells and posterior irradiation of these cells with visible light. After activation, the drug may generate reactive oxygen species (ROS) such as singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) and radicals ($\bullet\text{O}_2^-$, $\bullet\text{OH}$), which are capable of damaging membranes, DNA and other cell structures, inducing apoptosis or necrosis of tumor cells. Folic acid is super-expressed on the surface of some cancers cells (especially gynecological cancer cells) and can play the role of target system, becoming an important ally for drug delivery systems. This study evaluated the use of folic acid as an additive to liposomes containing chloro-aluminum phthalocyanine as a photosensitizer drug, applied in PDT with MCF7 cells. These studies showed that liposomal systems have nanometer size (less than 200 nm) and have biocompatibility when evaluated in monolayer cell culture. Moreover, it was possible to observe satisfactory phototoxic effect of the formulations and increased internalization of the drug when folic acid is used.

Key words: Photodynamic Therapy, liposome, chloro-aluminum phthalocyanine, folic acid, cell line MCF7.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da sequência de eventos que ocorrem na Terapia Fotodinâmica. 1) Administração do FF; 2) Acúmulo do FF preferencialmente no tecido neoplásico; 3) Irradiação com laser, LED ou fonte de luz monocromática para a ativação do FF 4) Morte do tecido neoplásico lesionado.....	3
Figura 2 - Diagrama de Jablonski simplificado. Ilustra os processos eletrônicos que uma molécula pode sofrer ao absorver energia. S_0 : estado singlete fundamental; S_1 : estado singlete excitado; S_n : estado singlete excitado, T_1 : estado triplete excitado, O_2 : oxigênio molecular; EROs: espécies reativas de oxigênio, 1O_2 : oxigênio singlete (PRIMO, F. L., 2009).....	4
Figura 3 - Estrutura química da ftalocianina de cloro-alumínio.....	8
Figura 4 – Representação da estrutura do fosfolipídio, bicamada lipídica e lipossoma (adaptado de Enciclopédia Britânica, 2007).....	9
Figura 5 - Estrutura química do ácido fólico (ácido pteroil-L-glutâmico).	11
Figura 6 - Aparelhagem de preparo de lipossoma por injeção etanólica. 1) Bomba de injeção; 2) agitador magnético; 3) recipiente cilíndrico; 4) seringa de vidro.....	14
Figura 7 - Equipamento utilizado para realizar as medidas de tamanho de partícula e índice de polidispersão.	16
Figura 8 - Espectros de absorção (A) da ftalocianina de cloro-alumínio em etanol com $\lambda_{max} = 670\text{ nm}$ – banda Q; (B) do ácido fólico em tampão PBS, com $\lambda_{max} = 281\text{ nm}$	24

Figura 9 - Espectro normalizado de emissão de fluorescência no UV-visível, com excitação 615 nm para ■ AlClPc livre, ■ AlClPc lipossomal após a destruição da vesícula, ■ Lp-AlClPc e ■ Lp-AlClPc+AF (0,5µM).....	25
Figura 10 - Estudo de estabilidade avaliando o diâmetro hidrodinâmico das vesículas lipossomais, durante 75 dias de avaliação para os lipossomas: ■ Lp-VZ, ■ Lp-AlClPc, ■ Lp-AlClPc+AF (0,5 mM), ■ Lp-AlClPc+AF (0,75 mM), □Lp-AlClPc+AF (1,0 mM), □ Lp-AF.	28
Figura 11 - Células MCF7 durante a terceira passagem, ao atingirem confluência com aumento de 10 vezes.	31
Figura 12 - Ensaio in vitro de citotoxicidade da AlClPc (de 0,5 a 8,7 µmol/L) livre em células MCF7. Sendo que CT = controle; DMSO = dimetilsulfóxido, solvente utilizado para a diluição do fármaco. Com significância estatística * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação ao controle.	32
Figura 13 - Ensaio in vitro de citotoxicidade do ácido fólico (de 2 a 500 µmol/L) livre em células MCF7. Sendo que CT = controle. Sem significância estatística em relação ao controle.	33
Figura 14 - Ensaio in vitro de citotoxicidade do lipossoma contendo somente AlClPc (0,06 a 0,5 µmol/L) em células MCF7. Sendo que CT = controle. Sem significância estatística em relação ao controle.	33
Figura 15 - Ensaio in vitro de citotoxicidade do lipossoma contendo AlClPc (0,02 a 0,5 µmol/L) e ácido fólico (com concentração variando entre 31,25 e 250,0 µmol/L) em células MCF7. Sendo que CT = controle. Sem significância estatística em relação ao controle.	34

Figura 16 - Porcentagem de células MCF7 viáveis após 3 horas de incubação com AlClPc livre, após irradiação com laser. Significância estatística * $p < 0,05$ em relação ao controle.	35
Figura 17 - Porcentagem de células MCF7 viáveis após 3 horas de incubação com Lp-AlClPc, após irradiação com laser. Significância estatística * $p < 0,05$ em relação ao controle.	36
Figura 18 - Porcentagem de células MCF7 viáveis após 3 horas de incubação com Lp-AlClPc+AF (0,5 mM), após irradiação com laser. Significância estatística * $p < 0,05$ em relação ao controle.	36
Figura 19 - Porcentagem de células MCF7 viáveis após 3 horas de incubação com Lp-VZ e Lp-AF, após irradiação com laser. Significância estatística * $p < 0,05$ em relação ao controle.	37
Figura 20 - Fotos de microscopia confocal de células MCF7 incubadas com (I) AlClPc livre, (II) Lp-AlClPc e (III) Lp-AlClPc+AF (0,5 μ M). Na primeira coluna, a coloração azul mostra o núcleo celular, corado com DAPI; na segunda coluna a coloração vermelha é resultado da emissão de fluorescência da AlClPc intracelular e na terceira coluna as imagens estão sobrepostas.	39
Figura 21 - Fotos de microscopia confocal de células HaCat incubadas com (I) AlClPc livre, (II) Lp-AlClPc e (III) Lp-AlClPc+AF (0,5 μ M). Na primeira coluna, a coloração azul mostra o núcleo celular, corado com DAPI; na segunda coluna a coloração vermelha é resultado da emissão de fluorescência da AlClPc intracelular e na terceira coluna as imagens estão sobrepostas.	40

Figura 22- Espectros de emissão de fluorescência do controle (CT*), do Lp-AIClPc intracelular e do Lp-AIClPc-AF (0,5 mM) intracelular, em células MCF7 (linha contínua) e células HaCat (linha tracejada).41

Figura 23 - Porcentagem de formulação internalizada em células MCF7 e HaCat após 3 horas de incubação. Sendo que corresponde ao Lp-AIClPc e corresponde ao Lp-AIClPc+AF. Significância estatística * $p < 0,05$ em relação ao controle.....42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Abreviatura utilizada para designar cada formulação lipossomal.	23
Tabela 2 - Tamanho médio das vesículas e índice de polidispersão para as formulações lipossomais.	27
Tabela 3 - Concentração ($\mu\text{mol/L}$) de AICI ₃ calculada para cada lipossoma.	29
Tabela 4 - Composição dos meios de cultura testados para cultivo das células MCF7.	30
Tabela 5 - Tempo de confluência para a linhagem celular MCF7 em função do meio de cultura utilizado no estudo.	30

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

•O ₂ ⁻	Ânion superóxido
•OH	Radical hidroxila
¹ O ₂	Oxigênio singlete
AA	Aminoácidos essenciais
AF	Ácido Fólico
AlClPc	Ftalocianina de cloro-alumínio
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC [®]	American Type Culture Collection
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DDS	Drug delivery systems
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DSPC	1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina
EMEM	Eagle's Minimal Essential Medium
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FDA	Food and Drug Administration
FF	Fármaco fotossensibilizante
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IPd	Índice de polidispersão
LED	Light Emitting Diode
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio
PDT	Photodynamic Therapy
ROS	Reactive oxygen species
S ₀	Estado singlete fundamental
S ₁	Primeiro estado singlete excitado
SFB	Soro fetal bovino
S _n	Estado singlete excitado
T ₁	Primeiro estado triplete excitado
TFD	Terapia Fotodinâmica

SUMÁRIO

RESUMO.....	<i>i</i>
ABSTRACT.....	<i>ii</i>
LISTA DE FIGURAS.....	<i>iii</i>
LISTA DE TABELAS.....	<i>vii</i>
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	<i>viii</i>
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Câncer de Mama.....	1
1.2 Terapia Fotodinâmica	2
1.3 Fármacos Fotossensibilizantes: Ftalocianinas.....	6
1.4 Lipossomas como Sistemas de Liberação de Fármacos	8
1.5 Ácido Fólico.....	10
2. OBJETIVOS.....	12
2.1 Objetivos gerais	12
2.2 Objetivos específicos.....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1 Material.....	13
3.2 Método	14
3.2.1 Preparo dos Lipossomas.....	14
3.2.2 Estudos espectroscópicos.....	15
3.2.3 Determinação do tamanho de partícula por espalhamento dinâmico de luz e índice de polidispersão.....	15
3.2.4 Estudo de estabilidade dos lipossomas	16
3.2.5 Quantificação da AICIPc nanoestruturada nas formulação lipossomais.....	17

3.2.6	Cultivo e expansão da linhagem celular de adenocarcinoma de mama humano (MCF7)	17
3.2.7	Cultivo e expansão da linhagem celular de queratinócitos humanos (HaCat)	18
3.2.8	Controle da integridade da membrana celular	19
3.2.9	Ensaio de Citotoxicidade	19
3.2.10	Ensaio de Fototoxicidade	20
3.2.11	Internalização celular (uptake)	21
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1	Preparo dos lipossomas	23
4.2	Estudos espectroscópicos	23
4.3	Determinação do tamanho de partícula por espalhamento dinâmico de luz e Índice de Polidispersão	26
4.4	Estudo de estabilidade dos lipossomas	28
4.5	Quantificação da AICIPc nanoestruturada nas formulações lipossomais	29
4.6	Cultivo e expansão da linhagem celular de adenocarcinoma de mama humano (MCF7)	29
4.7	Ensaio de citotoxicidade	31
4.8	Ensaio de Fototoxicidade	34
4.9	Internalização Celular	38
5.	CONCLUSÃO	44
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de Mama

Faz parte do desenvolvimento normal de células humanas o crescimento multiplicação e morte. Quando ocorre a perda do controle da divisão celular, pode haver invasão às células e tecidos adjacentes. Esse crescimento desordenado e agressivo, na maioria das vezes, caracteriza um conjunto de mais de 100 doenças denominadas câncer.

O câncer de mama é, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o segundo tipo mais frequente no mundo e o mais comum entre as mulheres, correspondendo a 22% dos novos casos a cada ano. Sua incidência cresce progressivamente após os 35 anos de idade (INCA, 2013).

Estudos recentes mostram que a origem do câncer de mama pode estar relacionada ao comprimento de telômeros em cromossomos presentes nas glândulas mamárias (KANNAN et al., 2013), pois são mais curtos o que facilita a fusão cromossomal *end-to-end* (ARTANDI e DEPINHO, 2010; GILLEY, TANAKA e HERBERT, 2005). Com o passar do tempo (ou aumento da idade) ocorre diminuição da atividade de telomerasas, o que leva ao maior número de telômeros curtos (ARTANDI e DEPINHO, 2000; KANNAN et al., 2013).

Dentre as formas de tratamento estão a quimioterapia, a radioterapia e a cirurgia, podendo ser usadas em conjunto, entretanto, o diagnóstico prematuro é essencial para a eficácia da cura (Ministério da Saúde; INCA, 2011). Esses tratamentos não atingem somente o tecido lesado e causam diversos efeitos colaterais como queda de cabelo, náusea e vômito, aumento do risco de infecções, astenia, obstrução intestinal e até mesmo mutilação em alguns casos de cirurgia, podendo levar a danos psicológicos (Ministério da Saúde; INCA, 2011).

Surge, portanto, a necessidade de novas formas terapêuticas que possibilitem a diminuição do tumor e que restrinjam os efeitos nocivos ao tecido doente, protegendo o tecido saudável.

1.2 Terapia Fotodinâmica

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é um procedimento clinicamente aprovado desde 1993 no Canadá, 1996 no Japão e em 2001 na Europa (KAWASE e ISEKI, 2013; TRIESSCHEIJN et al., 2006), pois envolve uma terapêutica minimamente invasiva que pode induzir atividades citotóxicas seletivas para células cancerosas localizadas em regiões específicas (ALLISON e MOGHISSI, 2013; LIU et al., 2010). Na última década houve grande aumento de pesquisas envolvendo o uso da TFD para aplicação em diversas patologias não neoplásicas (SIQUEIRA-MOURA et al., 2013), principalmente após a aprovação do uso do medicamento Photofrin[®] pela FDA (U.S. Food and Drug Administration) em 1998 (OLEINICK e EVANS, 1998).

A técnica para essa terapêutica compreende a aplicação de um agente fotossensibilizante (de origem natural ou sintética) que ao receber luz visível com dose específica e no comprimento de onda adequado, na faixa de maior absorção pelo fármaco, desencadeia um processo fotooxidativo de dano celular, induzido pela produção de radicais livres. Baseia-se, nesse caso, na capacidade do fármaco fotossensibilizante (FF) em se acumular seletivamente em tecidos tumorais que ao absorver luz, num determinado comprimento de onda, na presença de oxigênio molecular, pode levar a dano ou morte celular, figura 1 (LIANG et al., 2011). Esse campo de pesquisa básica vem crescendo significativamente e apresenta grande potencial (AGOSTINIS et al., 2011; PASZKO et al., 2010) para o tratamento de cânceres e outras patologias.

Figura 1 - Representação esquemática da sequência de eventos que ocorrem na Terapia Fotodinâmica. 1) Administração do FF; 2) Acúmulo do FF preferencialmente no tecido neoplásico; 3) Irradiação com laser, LED ou fonte de luz monocromática para a ativação do FF, 4) Morte do tecido neoplásico lesionado.

A TFD é composta por três componentes essenciais: FF, luz e oxigênio molecular. Nenhum desses agentes é individualmente tóxico, mas juntos eles iniciam uma sequência de reações fotoquímicas e fotobiológicas que geram oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e outras espécies reativas (AGOSTINIS et al., 2011; DOUGHERTY et al., 1998). Este é, portanto, um fator essencial na minimização de efeitos colaterais, já que, somente o FF que for ativado pela luz visível irá desencadear a resposta biológica, evitando danos às células saudáveis, que não recebem a fotoativação.

Além disso, a TFD é especialmente interessante para a terapia anticâncer devido à característica das células cancerosas de acumular e manter aprisionado no seu interior o FF por um tempo maior do que aquele observado em células normais (PLAETZER et al., 2009).

As etapas fotofísicas e fotoquímicas envolvidas no processo de fotossensibilização do fármaco após receber radiação visível que pode gerar espécies reativas capazes de promover a

morte celular são explicadas de forma geral pelo Diagrama de Jablonski, figura 2, onde uma sequência de eventos radioativos e não-radioativos desativam as moléculas fotossensibilizadoras que absorveram luz.

Figura 2 - Diagrama de Jablonski simplificado. Ilustra os processos eletrônicos que uma molécula pode sofrer ao absorver energia. S_0 : estado singlete fundamental; S_1 : estado singlete excitado; S_n : estado singlete excitado, T_1 : estado tripleto excitado, O_2 : oxigênio molecular; EROs: espécies reativas de oxigênio, 1O_2 : oxigênio singlete (PRIMO, F. L., 2009).

O FF ao absorver luz num comprimento de onda adequado passa do seu estado singlete fundamental (S_0) para um estado singlete excitado de maior energia S_n , do qual desativa rapidamente ao mais baixo estado excitado singlete S_1 . Ao popular o primeiro estado singlete excitado (S_1), podem ocorrer 3 processos:

- Transição não-radioativa, na qual o FF retorna ao estado S_0 por meio de relaxação física chamada de conversão interna – emissão de calor;
- Transição radioativa, na qual o FF retorna ao estado S_0 emitindo um fóton de luz – emissão de fluorescência (usada em processos de fotodiagnóstico);

- Cruzamento inter-sistema, passando ao estado triplete excitado T_1 .

Quando há uma alta população do estado singlete excitado ocorre a transferência ao estado triplete excitado (T_1), no qual ocorre inversão de spin com dois elétrons desemparelhados. Ao popular o estado T_1 , o FF apresenta conformação eletrônica e energia discretamente menor que no estado S_1 , porém maior tempo de vida (10^{-6} à 10^{-3} segundos) (PRIMO, F. L., 2009), o que permite que reaja com outras espécies.

Nesse estado, o FF pode retornar ao estado fundamental por relaxação física (transição não radioativa) ou com emissão de fosforescência (transição radioativa), ou ainda, o FF pode desencadear reações fotoquímicas que se processam por dois mecanismos básicos (tipo I e tipo II), o que tornam possível seu uso para TDF (FOOTE, 1991; PRIMO, F. L., 2009).

No mecanismo do tipo I, o FF no estado triplete excitado pode abstrair prótons ou transferir elétrons para outras macromoléculas biológicas, formando radicais livres ou íons radicais. Ao reagir com o oxigênio molecular, esses radicais levam a formação de ânions superóxidos ou radicais hidroxila, que causam danos irreparáveis ao tecido tumoral (BARBUGLI, P. A., 2010; PLAETZER et al., 2009), conhecidos como danos induzidos por EROs.

No mecanismo do tipo II, há transferência direta de energia para o oxigênio molecular, que na natureza se encontra no estado triplete, levando à formação de oxigênio singlete excitado (1O_2). O oxigênio singlete produzido pela reação do tipo II é um agente altamente citotóxico, capaz de matar diretamente células neoplásicas através da indução de apoptose e/ou necrose (CASTANO, DEMIDOVA e HAMBLIN, 2005; DE ROSA et al., 2003; SIQUEIRA-MOURA et al., 2013). Isso porque, o 1O_2 causa danos às várias estruturas celulares, induzindo quebra do DNA genômico, destruição da membrana plasmática e de organelas como lisossomos e mitocôndrias (BARBUGLI, P. A., 2010; DE PAULA et al., 2012), que em conjunto ou separadamente matam a célula doente.

A idéia principal da Terapia Fotodinâmica fundamenta-se, portanto, em encontrar um fármaco fotossensibilizante que:

- não seja decomposto rapidamente pela absorção da luz visível (evitando assim que o mesmo seja destruído antes de efetuar o dano fotodinâmico previsto);
- possua alta afinidade e penetração no tecido doente em detrimento ao tecido saudável, fator este que é favorecido pelo aumento no grau de hidrofobicidade da molécula fotossensibilizante;
- seja fotodinamicamente eficiente na destruição do tecido tumoral sob ação de baixos níveis de luz visível (DE PAULA et al., 2013; STERNBERG , DOLPHIN e BRUCKNER, 1998).

Em suma, o objetivo essencial da TFD é induzir uma morte celular do tecido neoplásico por um processo de fotossensibilização que ativa vias apoptóticas ou necróticas, enquanto minimiza os danos causados aos tecidos vizinhos e efeitos colaterais indesejáveis no tratamento (ZHOU, 1989).

1.3 Fármacos Fotossensibilizantes: Ftalocianinas

Nos últimos anos tem sido investigada a potencialidade do uso de corantes fotossensibilizantes como compostos ativos no tratamento fotoquímico-terápico de tecidos tumorais (ALLISON et al., 2004), definindo-se uma nova linha de ação na TFD (BOLFARINI et al., 2012; DE PAULA et al., 2012; MACAROFF et al., 2006; NUNES, 2004; PRIMO et al., 2008; PRIMO , BENTLEY e TEDESCO, 2008; SIQUEIRA-MOURA et al., 2013).

Ftalocianinas são FF muito promissores em TFD, contudo são solúveis apenas em solventes orgânicos, uma vez que sua estrutura química é altamente conjugada. As vantagens das ftalocianinas são, entre outras, alta estabilidade térmica, alta absorção de luz no visível (na

faixa espectral de 600 a 800 nm, conhecida como janela terapêutica – onde existe transparência do tecido biológico e absorção diferenciada) e capacidade de ajustar seu potencial de oxidação e redução, quando é alterado o átomo central do anel pirrólico permitindo a inserção de substituintes periféricos que mudam suas propriedades químicas (GALLEGO-GOMEZ et al., 2009). Suas propriedades fotofísicas são fortemente influenciadas pela presença e natureza do íon metálico central, o que é refletido diretamente no rendimento quântico de fluorescência e tempo de vida dos estados excitados singlete e tripleto e processos de transferência de energia (BONNETT, 2000; BONNETT, 1998).

Estudos mostram que um bom exemplo entre os derivados de ftalocianinas (segunda geração) é a ftalocianina de cloro-alumínio (AlClPc), muito usada nos estudos em TFD (BOLFARINI et al., 2012; DE PAULA et al., 2012; LONGO et al., 2012; PRIMO et al., 2007; ROCHA et al., 2012; SIMIONI et al., 2011; SIQUEIRA-MOURA et al., 2013).

AlClPc é uma molécula constituída de um macrociclo tetrapirrólico com um íon metálico central (Al^{3+}), figura 3. A incorporação de um metal diamagnético, neste caso o alumínio, dentro do macrociclo fornece às ftalocianinas propriedades fotofísicas e fotoquímicas mais favoráveis para aplicação em TFD, isto é, estado singlete excitado de vida relativamente curta e bom rendimento quântico de estado tripleto excitado T_1 , que levam aos processos fotobiológicos de produção de espécies reativas de oxigênio, EROs (BONNETT, 2000; LONGO et al., 2012; PELOW, CHUNG e BAXTER, 2012; SIQUEIRA-MOURA et al., 2013).

Figura 3 - Estrutura química da ftalocianina de cloro-alumínio.

A natureza hidrofóbica das ftalocianinas é fundamental porque pode aumentar a afinidade do FF pelo tecido neoplásico (DOUGHERTY et al., 1998), contudo, essa propriedade compromete sua administração intravenosa que necessita de meio fisiológico (VIOR et al., 2011), dificultando a aplicação em TFD. Faz-se necessário então, sua veiculação em sistemas de liberação de fármacos conhecidos como DDS - *drug delivery systems*, capazes de solubilizar e controlar sua biodistribuição *in vivo* e *in vitro*.

1.4 Lipossomas como Sistemas de Liberação de Fármacos

Atualmente, vários tipos de sistemas de liberação têm sido desenvolvidos associando-se um FF para aplicação sistêmica e/ou tópica para tratamento de câncer (BICALHO et al., 2013; BOLFARINI et al., 2012). O interesse em sistemas nanométricos de liberação de fármacos cresceu exponencialmente na última década (LAOUINI et al., 2011; PRIMO et al., 2007; SIMIONI et al., 2007).

Na terapia anticâncer, a administração sistêmica de drogas quimioterápicas resulta na exposição de todos os tecidos em diferentes concentrações de drogas citotóxicas. Portanto, há uma necessidade de fornecer regimes de dose suficiente, constantes e em faixas aceitáveis para matar as células tumorais, mas que induzam apenas um mínimo de toxicidade para os

tecidos não cancerosos (JACKSON et al., 2011) o que vem de encontro aos sistemas nanométricos de liberação de fármacos.

Lipossomas são vesículas esféricas formadas por bicamadas concêntricas de fosfolípidios que se organizam espontaneamente em meio aquoso, figura 4. Destacam-se dentre os sistemas nanométricos de liberação de fármacos porque permitem incorporar fármacos hidrofóbicos na dupla camada lipídica e fármacos hidrofílicos na fase aquosa, mantendo suas características físico-químicas, além de promoverem sua distribuição seletiva nos tecidos quando incorporados de forma eficiente aos lipossomas (HOEBEKE, 1995).

Figura 4 – Representação da estrutura do fosfolipídio, bicamada lipídica e lipossoma (adaptado de Enciclopédia Britânica, 2007).

Essa estrutura a partir de fosfolípidios (aniônicos, catiônicos ou zwitteriônico) é semelhante à membrana da célula o que lhe confere alta afinidade por bicamadas celulares (FAN et al., 2013; KAYE e RICHARDSON, 1979; LONDON, 2013). Uma das grandes vantagens do uso dos lipossomas como sistemas de modelo de membranas biológicas reside no fato dos mesmos serem definidos como sistemas carregadores de fármacos que podem ser preparados a partir de constituintes naturais (BATISTA, CARVALHO e MAGALHÃES, 2007; FAN et al., 2013; HAYASHI et al., 2011; MAHERANI et al., 2012).

As vesículas lipossomais tem uma estrutura distinta, com uma dupla camada lipídica e uma fase aquosa interna, sendo assim, tem capacidade de reter moléculas lipofílicas e

hidrofílicas nas respectivas regiões. Outras vantagens são que os lipossomas podem encapsular diversos tipos de fármacos, protegê-los de uma resposta do sistema imunológico (*in vivo*), alterar a quantidade de material acumulado em cada tecido e prolongar o tempo de circulação. (HAYASHI et al., 2011).

1.5 Ácido Fólico

Aliados aos sistemas de liberação de fármacos existem alguns ligantes que atuam como vetores, direcionando o fármaco ao sítio desejado. Estes vetores podem estar ligados covalentemente à molécula ou associados aos seus respectivos sistemas de veiculação (DDS) ou ainda podem ser introduzidos através de modificações no tecido alvo (ZHOU et al., 2012; XIN et al., 2012; ASAI, 2012).

Normalmente, a superfície de muitos tipos de células neoplásicas expressa, em maior quantidade, alguns receptores capazes de se associar com ligantes específicos (CHO et al., 2008; LIU et al., 2010; WANG et al., 2008). Utilizando o receptor como um alvo em potencial, as drogas específicas delimitadas com ligante podem ser ativamente entregues e direcionadas para as células tumorais, o que aumenta a ação do ativo.

O ácido fólico (ácido pteroil-L-glutâmico) é muito interessante como vetorizador de fármacos para tecidos cancerosos, principalmente os ginecológicos. Isso porque o receptor de folato é super expressado na superfície de muitas células cancerosas tais como ovário, endométrio, mama, pulmão e rins (ASAI, 2012; LIU et al., 2010; PENG et al., 2011; VALENCIA et al., 2011).

O ácido fólico é a forma mais estável de folato, uma das vitaminas do complexo B. Não é encontrado naturalmente em tecidos vivos, para sua obtenção é necessário ingerir fontes alimentares como extratos de leveduras, vegetais de folhas verdes, frutas cítricas e outros alimentos. Nos últimos anos tem sido usado regularmente como suplemento alimentar

em diversos países, principalmente nos EUA, onde a fortificação de farinhas com ácido fólico é exigida pela FDA desde 1998 (SMITH, 2007). No Brasil a fortificação de farinhas de trigo e milho, tanto de uso comercial quanto industrial, é obrigatória desde 2004, segundo resolução da ANVISA (ANVISA, 2002).

A deficiência de ácido fólico está relacionada a defeitos do tubo neural, vários tipos de cânceres, anemias, demência, síndrome de Down, e condições graves que podem afetar a gravidez e o nascimento (LUCOCK, 2000; ONER et al., 2006; SMITH, 2007). Além disso, o ácido fólico é muito estável, com mínima imunogenicidade e tem boa compatibilidade com matéria orgânica e inorgânica.

Figura 5 - Estrutura química do ácido fólico (ácido pteroil-L-glutâmico).

Devido a essas vantagens, torna-se o aditivo ideal com uma boa perspectiva para a aplicação em sistemas de liberação de fármaco para tumores – como sistema alvo-específico (KE, MATHIAS e GREEN, 2003; PENG et al., 2011), considerado, portanto, como um bom candidato ao direcionamento específico de fármacos ao tumor de mama (LIANG et al., 2011; LIU et al., 2010).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Avaliar os efeitos da Terapia Fotodinâmica, utilizando sistemas lipossomais contendo AlClPc como fármaco fotossensibilizante e ácido fólico como vetorizador lipossomal, aplicado aos estudos em células de adenocarcinoma mamário humano.

2.2 Objetivos específicos

- i. Desenvolver e padronizar a produção dos sistemas lipossomais de AlClPc com ácido fólico incorporado;
- ii. Caracterizar a formulação de AlClPc lipossomal através suas propriedades e características fotofísicas como estabilidade, tamanho das vesículas e homogeneidade da formulação e propriedades fotoquímicas;
- iii. Avaliar os efeitos *in vitro* dos sistemas de AlClPc nanoestruturados contendo AF, utilizados na TFD em modelo de cultura celular em monocamada.
- iv. Avalizar a potencialidade do sistema proposto frente aos sistemas convencionais descritos para uso em TFD para tratamento específico de câncer de mama.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Na preparação lipossomal foram utilizados o lipídio 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), com 99% de pureza, e o colesterol, com 98% de pureza, adquiridos da Avanti Polar Lipids (Alabama, EUA), a ftalocianina de cloro-alumínio, com 85% de pureza, foi comprada da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), o ácido fólico foi obtido da Across Organics, com 96-102 % de pureza. O etanol grau analítico (Sigma-Aldrich) foi utilizado sem tratamento prévio. O tampão fosfato, pH~7,4 foi preparado a partir de pastilhas (Sigma-Aldrich), utilizando água ultra pura obtida através do sistema de purificação de água da Millipore Direct-Q® 3.

A linhagem celular de adenocarcinoma mamário feminino, MCF7, foi obtida da American Type Culture Collection, (ATCC® HTB-22™). Para os estudos biológicos foram utilizados os meios de cultura celular Dulbecco's Modified Eagle Medium – DMEM (Gibco), Eagle's Minimal Essential Medium – EMEM e tampão Hank's da (Cultilab). Insulina de pâncreas bovino e bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), anfotericina e antibiótico – penicilina/estreptomicina (Cultilab), tripsina-EDTA, soro fetal bovino – SFB – estéril e aminoácidos essenciais (AA) (Gibco).

Foram utilizados nos estudos fotobiológicos básicos o protocolo de contagem e avaliação da viabilidade celular o brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT, com 97,5 % de pureza da Sigma-Aldrich) e o corante azul de tripan (Sigma-Aldrich, ~40%).

3.2 Método

3.2.1 Preparo dos Lipossomas

Os lipossomas com AICI_{Pc} incorporada foram preparados pelo método de injeção etanólica, já descrito na literatura com adaptações (BARBUGLI et al., 2010; SIMIONI et al., 2008).

Uma solução etanólica contendo DSPC, colesterol e um volume adequado do FF (AICI_{Pc} em etanol), foi injetada numa jaqueta termostatzada contendo tampão fosfato pH 7,4 por uma bomba peristáltica de adição controlada da World Precision Instruments (WPI), modelo SP 100i.

A solução tampão (pH 7,4) estava contida em um recipiente cilíndrico de 2,0 cm de diâmetro e a injeção foi realizada à aproximadamente 2,5 cm abaixo da superfície líquida, figura 6. A injeção foi realizada a 56°C sob agitação magnética, na ausência de luz e com uma velocidade de 360 µL/h.

Figura 6 - Aparentagem de preparo de lipossoma por injeção etanólica. 1) Bomba de injeção; 2) agitador magnético; 3) recipiente cilíndrico; 4) seringa de vidro.

Paralelamente, foram preparados lipossomas vazios sem adição do FF e do aditivo ácido fólico e somente com ácido fólico, com o objetivo de usá-los como referência nos estudos comparativos. O ácido fólico foi incorporado à fase aquosa, na faixa de concentração de 0,5 a 1,0 mmol/L.

3.2.2 Estudos espectroscópicos

Nos estudos espectroscópicos foi utilizado o espectrofotômetro de absorção UV/visível modelo Lambda 20 da Perkin Elmer e o espectrofluorímetro Fluorolog-3 da Jobin Ivon-SPEX.

A investigação das propriedades espectroscópicas, tanto da AlClPc quanto do ácido fólico, foi baseada em medidas diretas dos espectros de absorção (na faixa de 300-800 nm para a AlClPc e de 250-800 nm para o ácido fólico) e de emissão de fluorescência (com comprimento de onda de excitação física em 615 nm para a AlClPc e emissão na faixa de 650-700 nm com máximo em 680 nm). Para a análise das propriedades espectrofotométrica dos lipossomas, foi necessário o rompimento da vesícula lipossomal com a adição de acetonitrila sob agitação à 56°C (temperatura de transição do lipídio) e posterior centrifugação 5000 rpm a 4°C por 20 min, com base no trabalho de Primo, F. L. (PRIMO, F. L., 2009).

Os espectros de absorção e fluorescência foram registrados em uma cela de quartzo de 1 cm de caminho óptico, utilizando-se como referência, o meio em estudo na ausência da AlClPc ou do ácido fólico.

3.2.3 Determinação do tamanho de partícula por espalhamento dinâmico de luz e índice de polidispersão

Nos estudos do tamanho das partículas e índice de polidispersão (IPd) foi utilizado o equipamento Zetasizer Nano system ZS da Malvern-UK, que possui um laser de He-Ne de 4 mW que opera no comprimento de onda de 633 nm, permitindo realizar medidas não invasivas por “backscatter optics” (NIBS), e possui a capacidade de determinar tamanho de partículas no intervalo de 2 nm a 3 µm. As medidas foram realizadas num ângulo de detecção de 173° e a posição da medida na cubeta foi automaticamente determinada pelo software do

equipamento. O diâmetro hidrodinâmico das partículas coloidais foi determinado empregando-se a espectroscopia de fotocorrelação por espalhamento dinâmico de luz.

Figura 7 - Equipamento utilizado para realizar as medidas de tamanho de partícula e índice de polidispersão.

Foram avaliados os tamanhos de partículas e o índice de polidispersão do lipossoma na ausência e presença de ácido fólico, por um período de 2 meses e meio, verificando-se assim a influência direta da incorporação deste na formulação.

As leituras foram realizadas utilizando-se o conjunto de cubetas de acrílico padronizadas do próprio equipamento e os dados foram fornecidos pelo software Zetasizer versão 6.01.

3.2.4 Estudo de estabilidade dos lipossomas

A estabilidade das formulações lipossomais foi investigada num período de 3 meses avaliando-se regularmente o tamanho das vesículas a cada 15 dias. As análises foram realizadas através de medida direta, como descrito em 3.2.3. As determinações foram feitas em triplicatas a 25°C. As amostras utilizadas foram estocadas em temperatura ambiente e protegidas da luz.

3.2.5 *Quantificação da AlClPc nanoestruturada nas formulações lipossomais*

A AlClPc foi quantificada seguindo o método de quantificação da ftalocianina de cloro-alumínio em nanocarregadores, descrito e validado por Siqueira-Moura e colaboradores (SIQUEIRA-MOURA et al., 2010), utilizando a equação de regressão linear:

$$I = 2,24 \times 10^6 \times [\text{AlClPc}, \mu\text{g.mL}^{-1}] + 9,74 \times 10^4$$

Onde I é a intensidade relativa de fluorescência. Para isso foi necessário o rompimento das vesículas lipossomais para evitar a interferência da bicamada lipídica nos estudos espectroscópicos. Adicionou-se 1 mL de lipossoma e acrescentou-se 9 mL de acetonitrila. O rompimento foi realizado em balão volumétrico de 10 mL, envolto por uma jaqueta termostaticada a 56°C, sob agitação durante 30 minutos. Então a solução foi submetida à ultracentrifugação a 5000 rpm e 4°C durante 20 minutos e posteriormente feita a análise por espectroscopia de fluorescência, com λ_{exc} em 615nm e λ_{em} 674 nm.

3.2.6 *Cultivo e expansão da linhagem celular de adenocarcinoma de mama humano (MCF7)*

A cultura primária de células de carcinoma de mama humano foi obtida originalmente por derrame pleural de um paciente do sexo feminino com doença metastática. Para cultivo e expansão celular, foram testados os 4 tipos diferentes de meio de cultura, a fim de se avaliar qual o meio mais adequado ao crescimento das células. Durante o cultivo, as células foram mantidas em incubadora monitorada por uma controladora digital a 37°C, com atmosfera úmida e 5,0% de CO₂. Procedimento padrão adotado pela ATCC®.

Ao atingirem confluência – fase do cultivo em que as células completam todo o fundo da garrafa (ou outro recipiente de cultivo) formando uma monocamada, as células foram

soltas por tripsinização com solução de tripsina 0,05% em tampão Hank's. A mistura foi então centrifugada por 5 minutos; em seguida as células foram ressuspensas em 10 mL de meio de cultura e replaqueadas. O meio foi renovado até três vezes por semana. Toda a manipulação foi realizada em capela de fluxo laminar, modelo Pachane 400 (Pachane), esterilizada com luz germicida e fluxo contínuo de ar.

Para manutenção da linhagem celular foi realizado o congelamento das células com meio crioprotetor, composto por soro fetal bovino e 5% de dimetilsulfóxido (DMSO), os tubos criogênicos contendo as células são mantidos em nitrogênio líquido a aproximadamente -196°C.

3.2.7 Cultivo e expansão da linhagem celular de queratinócitos humanos (HaCat)

As células de queratinócitos humanos, HaCat, foram concedidas pelo Laboratório de Estudos Genômicos da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP de São José do Rio Preto, sob coordenação da Profa. Dra. Paula Rahal. Essas células foram utilizadas nos estudos de internalização celular, que serão abordados no item 3.2.11., para fins de comparação, pois se trata de uma linhagem não-neoplásica.

O meio de cultura celular utilizado foi DMEM, suplementado com 10% de SFB, anfotericina (250 µL/100 mL) e antibiótico (1 mL/100 mL). Durante o cultivo, as células foram mantidas em incubadora monitorada por uma controladora digital a 37°C, com atmosfera úmida e 5,0% de CO₂. O meio de cultura foi renovado até três vezes por semana. Toda a manipulação foi realizada em capela de fluxo laminar, modelo Pachane 400 (Pachane), esterilizada com luz germicida e fluxo contínuo de ar.

Para manutenção da linhagem celular foi realizado o congelamento das células com meio crioprotetor, composto por soro fetal bovino e 10% de DMSO, os tubos criogênicos contendo as células são mantidos em nitrogênio líquido a aproximadamente -196°C.

3.2.8 *Controle da integridade da membrana celular*

Este teste, conhecido como teste de exclusão do Azul de Tripán, foi realizado antes de todos os testes de citotoxicidade e fototoxicidade. O mesmo permite analisar a integridade da membrana celular como controle de viabilidade em função do crescimento, a fim de avaliar o número médio de células presente na cultura. Inicialmente foi feita uma mistura de 100 µL da solução de Azul de Tripán 0,4% e 100 µL da suspensão de células em meio de cultura. A seguir, esta solução foi agitada e 10 µL foram adicionados na câmara de Neubauer. A contagem dentro da câmara foi realizada em microscópio no campo claro na objetiva de aumento de 10X, sendo contadas apenas as células viáveis (não coradas em azul). Para todos os ensaios *in vitro* foram padronizadas as concentrações aproximadas de 2×10^5 células/poço, quando semeadas em placas de cultura de 24 poços e de 2×10^4 células/poço, quando semeadas em placas de cultura de 96 poços.

3.2.9 *Ensaio de Citotoxicidade*

A citotoxicidade do ácido fólico e da AIClPc livres e nanoestruturados nos sistemas lipossomais foi investigada através de curvas de dose-reposta obtidas pelo ensaio de viabilidade celular de MTT.

Depois de estabelecida a fase de confluência, as células foram tripsinizadas, plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 horas para adesão. Então foram incubadas, com as alíquotas do ácido fólico e da AIClPc livres e nanoestruturados no lipossoma, por 3 horas (37°C e 5% CO₂), avaliando-se sua faixa de concentração. Tais alíquotas foram diluídas no meio de cultura utilizado para o cultivo da célula. A seguir o meio de incubação foi descartado e as células cuidadosamente lavadas com solução de tampão.

Na sequência, foi adicionado 30 µL/poço de solução de MTT (5,0 mg/mL previamente dissolvidos em tampão Hank's) e 170 µL/poço de meio DMEM sem fenol, e as placas foram

incubadas por 4 horas. Após este período foi adicionado 200 µL de isopropanol para dissolução total do formazan formado. Em seguida, foram lidas em espectrofotômetro do tipo ELISA (Safire² – Tekan) em 560 nm com correção de absorção basal em 690 nm.

As medidas foram analisadas sempre em relação a um controle, ou seja, células que foram submetidas às mesmas condições no ensaio, entretanto sem a adição da formulação em estudo. O percentual de células viáveis foi calculado de acordo com a seguinte relação:

$$\text{Células viáveis} = (\text{D.O. amostra} / \text{D.O. controle}) \times 100\%$$

Sendo D.O. amostra = a absorbância do azul de formazan em 560 nm; D.O. controle = a absorbância do azul de formazan em 560 nm do controle. Os ensaios foram realizados em triplicada (n = 3).

3.2.10 Ensaios de Fototoxicidade

Foi avaliado o efeito da TFD sob a cultura celular MCF7 na presença do ácido fólico e da AlClPc livres e nanoestruturados no sistema lipossomal de AlClPc e no lipossoma de AlClPc com ácido fólico.

Depois de estabelecida a fase de confluência, as células foram tripsinizadas, plaqueadas em placas de 24 poços e incubadas por 24 horas para adesão. Então foram incubadas, com as alíquotas do ácido fólico e da AlClPc livres e nanoestruturados no lipossoma, após o período de incubação por 3 horas (37°C e 5% CO₂) as formulações foram retiradas, as células foram cuidadosamente lavadas com tampão Hank's e foi adicionado 500 µL do tampão. Em seguida, a cultura celular foi submetida à irradiação de laser nas doses de 100 e 150 mJ/cm². Para a irradiação foi utilizado o sistema laser de diodo Eagle modelo

Heron da Quantum Tech (São Carlos, Brasil), no comprimento de onda de emissão em 670 nm acoplado a uma fibra ótica operando no máximo de 830 mW de potência.

Ao término da irradiação, o tampão foi removido e foi adicionado meio de cultura 10%. Após 24 horas foi realizado o ensaio de viabilidade celular tipo MTT para a avaliação da viabilidade celular, conforme descrito no item 3.2.9, respeitando-se os volumes adequados à placa de 24 poços.

3.2.11 Internalização celular (uptake)

A. Microscopia Confocal

Para a análise por microscopia confocal, as células MCF7 (1×10^5 células/poço) e as células HaCat (2×10^5 células/poço) foram semeadas em placas de 24 poços sobre lamínulas. Após 24 horas, as células foram incubadas por 3 horas (37°C e 5% CO_2) com as formulações, sempre contendo a concentração de FF em $0,5 \mu\text{mol/L}$.

As células foram fixadas com solução de paraformaldeído 4% por 20 minutos, lavadas com tampão Hanks e então coradas com DAPI para melhor visualização do núcleo – foi utilizado o meio de montagem UltraCruz Mounting Media (Santa Cruz). Em seguida as lâminas foram montadas e observadas em microscópio confocal da Zeiss LSM T-PMT, com filtro para ftalocianinas (na região de 630 nm) e fotografadas com auxílio do software do próprio equipamento.

B. Emissão de fluorescência da AlClPc intracelular em sistema Safira

As células MCF7 e HaCat foram semeadas (2×10^5 células/poço) em placas de 24 poços. Após 24 horas, as células foram incubadas por 3 horas (37°C e 5% CO_2) com as formulações, sempre contendo a concentração de FF em $0,5 \mu\text{mol/L}$ e então lavadas com tampão Hank's para evitar resquícios do FF não internalizado nas células. Adicionou-se

300 μ L de tampão HanK's e foram efetuadas medidas de emissão de fluorescência em espectrofotômetro do tipo ELISA (Safire² – Tekan), de 650 nm a 800 nm, com comprimento de onda de excitação em 615 nm, diretamente na placa de cultivo.

Os dados fornecidos pelo software Magellan5 do próprio equipamento para cada poço de células tratadas com as formulações foram analisados em relação aos dados espectroscópicos obtidos pela medida direta da emissão de fluorescência do lipossoma contendo AlClPc, no mesmo equipamento. Portanto, considerou-se que a emissão de fluorescência do lipossoma contendo AlClPc, no comprimento de onda de 680nm, como sendo 100%.

Todas as análises foram feitas em triplicata. Os dados foram tratados com o software GraphPad Prism 3 e a significância estatística das diferenças entre os resultados obtidos foi determinada pelo teste de análise de variância One-way ANOVA seguido do pós-teste Tukey t-test para múltiplas comparações (* $p < 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Preparo dos lipossomas

Foram preparadas seis formulações lipossomais descritas na tabela 1.

Tabela 1 - Abreviatura utilizada para designar cada formulação lipossomal.

Abreviatura	Formulação
Lp-VZ	Lipossoma sem AlCLPC e sem ácido fólico
Lp-AlClPc	Lipossoma com AlCLPC e sem ácido fólico
Lp-AlClPc+AF (0,5 mM)	Lipossoma com AlCLPC e com ácido fólico 0,5 mM
Lp-AlClPc+AF (0,75 mM)	Lipossoma com AlCLPC e com ácido fólico 0,75 mM
Lp-AlClPc+AF (1,0 mM)	Lipossoma com AlCLPC e com ácido fólico 1,0 mM
Lp-AF	Lipossoma sem AlCLPC e com ácido fólico 1,0 mM

Os lipossomas foram preparados seguindo o método descrito em 3.2.1 e todos apresentaram estabilidade visível semelhante, homogênea e sem formação de agregados, contudo o tamanho das vesículas e o índice de polidispersão para cada formulação variou, como será abordado no item 4.3.

4.2 Estudos espectroscópicos

Seguem, na figura 8, os espectros de absorção do FF em etanol e do ácido fólico em tampão PBS.

O conjunto característico de bandas de absorção da AlClPc para as transições eletrônicas na região de 300 nm a 400 nm no ultravioleta próximo (bandas Soret) e para as transições vibracionais na região de 600 nm a 800 nm no vermelho e infravermelho próximo (bandas Q) pode ser observado. A banda Q é um ponto crucial para a eficiência do FF, pois se encontra dentro da chamada “janela terapêutica” (de 600 a 800 nm).

O ácido fólico apresenta absorvência máxima em 281 nm.

Figura 8 - Espectros de absorção (A) da ftalocianina de cloro-alumínio em etanol com λ_{max} = 670 nm – banda Q; (B) do ácido fólico em tampão PBS, com λ_{max} = 281 nm.

Nas ftalocianinas a conjugação do macrociclo é estendida por anéis benzênicos sobre quatro unidades pirrólicas, resultando em uma forte banda de absorção na região do vermelho do espectro visível, o que é uma vantagem frente a outros FF, como por exemplo o Photofrin®, um representante das porfirinas, que possui baixo comprimento de onda de ativação (na faixa de 630 nm), restringindo sua aplicação a cânceres superficiais e ainda

apresenta tempo de retenção prolongada, favorecendo a toxicidade cutânea após a TFD (JORI, 1996). Já a forte absorção da AlClPc na região da janela terapêutica permite sua aplicação à cânceres mais profundos, pois a luz penetra mais facilmente no tecido cutâneo nessa faixa.

Figura 9 - Espectro normalizado de emissão de fluorescência no UV-visível, com excitação 615 nm para ■ AlClPc livre, ■ AlClPc lipossomal após a destruição da vesícula, ■ Lp-AlClPc e ■ Lp-AlClPc+AF (0,5µM).

Na figura 9 podemos observar que os espectros de fluorescência do FF livre e do lipossoma após a destruição das vesículas possuem o mesmo perfil com máximo de emissão em 678 nm. Para o FF encapsulado no lipossoma, tanto para Lp-AlClPc quanto para Lp-AlClPc+AF (0,5µM), apesar do máximo de emissão manter-se próximo ao da ftalocianina livre, houve um pequeno descolamento da banda, com λ_{max} em 680 nm. Esse efeito batocrômico, com deslocamento para uma região de menor energia, é explicado pela interação do fármaco com os lipídios presentes na bicamada lipossomal (BARBUGLI, P. A., 2010; FERREIRA et al., 1999).

Dessa maneira, o processo de veiculação da ftalocianina não resultou em mudanças ou deslocamentos significativos à suas bandas de emissão evidenciando que não houve agregação ou degradação do FF.

Após a absorção de um fóton de luz, o fármaco fotossensível passa a popular um estado eletrônico singlete excitado mais energético, podendo retornar ao seu estado fundamental via processo de relaxação física ou através de processos radiativos de emissão de fluorescência. Caso o FF seja capaz de atingir ao estado triplete excitado com bons rendimentos quânticos pode ocorrer a formação de EROs, em especial o oxigênio singlete, principal agente da ação fotodinâmica nesse caso.

O perfil espectral da figura 9 confirma que ocorre o cruzamento intersistemas $S_1 \rightarrow T_1$, e a transição radioativa, comportamento esperado para as ftalocianinas e demais compostos fluorescentes.

4.3 Determinação do tamanho de partícula por espalhamento dinâmico de luz e Índice de Polidispersão

A tabela 2 traz os o tamanho médio das vesículas e seu índice de polidispersão. A avaliação do tamanho é imprescindível, pois esse é um dos fatores que controlam a cinética de liberação do fármaco, facilitando também a absorção pelas células, quando estão em escala nanométrica (BARBUGLI et al., 2010).

Tabela 2 - Tamanho médio das vesículas e índice de polidispersão para as formulações lipossomais.

Lipossoma	Tamanho (nm)	IPd
Lp-VZ	148,2 ± 2,3	0,26 ± 0,03
Lp-ALCIPc	135,4 ± 2,1	0,27 ± 0,03
Lp-ALCIPc+AF (0,5 mM)	152,3 ± 3,3	0,36 ± 0,01
Lp-ALCIPc+AF (0,75 mM)	187,4 ± 4,3	0,46 ± 0,04
Lp-ALCIPc+AF (1,0 mM)	190,3 ± 3,9	0,45 ± 0,02
Lp-AF	241,6 ± 2,8	0,74 ± 0,01

O diâmetro médio inferior a 200 nm é um dado muito importante e de grande valia para os estudos *in vitro*. Isso porque, lipossomas grandes são rapidamente removidos da circulação sanguínea por macrófagos, enquanto que lipossomas pequenos (lipossomas em escala nanométrica – SUV – Small Unilamellar Vesicles) são reconhecidos e fagocitados mais lentamente, o que lhes conferem maior tempo de circulação no organismo, aumentando sua probabilidade de penetração (BARBUGLI et al., 2010).

O índice de polidispersão $\leq 0,3$ para o Lp-VZ, Lp-ALCIPc e Lp-ALCIPc+AF (0,5 mM) indica uma boa homogeneidade de dispersão das vesículas lipossomais, favorecendo a estabilidade.

Pôde-se observar que a adição de ácido fólico confere um aumento no tamanho das vesículas bem como o aumento de sua concentração gera uma perda da homogeneidade da formulação lipossomal. Dessa forma, para os estudos *in vitro*, foi utilizado o lipossoma com ácido fólico na concentração de 0,5 mol/L a fim de se utilizar a formulação mais parecida com a que contém somente o FF.

O lipossoma contendo somente ácido fólico na sua mais alta concentração, sem o FF, apresentou um aumento no diâmetro médio das vesículas e no índice de polidispersão, evidenciando uma desestabilização da estrutura da dupla camada lipídica. A estrutura molecular do ácido fólico certamente localizado na interface lipídica externa desestabiliza a

estrutura do lipossoma causando o aumento de tamanho. A presença do FF altamente hidrofóbico, que se acomoda na dupla camada lipídica, confere maior estabilidade à formulação levando a redução do tamanho e maior homogeneidade.

4.4 Estudo de estabilidade dos lipossomas

Os lipossomas foram avaliados durante 2 meses e meio, com armazenagem em temperatura ambiente, aproximadamente 25°C, para verificar a estabilidade das formulações, figura 10.

Figura 10 - Estudo de estabilidade avaliando o diâmetro hidrodinâmico das vesículas lipossomais, durante 75 dias de avaliação para os lipossomas: ■ Lp-VZ, ■ Lp-AICIPc, ■ Lp-AICIPc+AF (0,5 mM), ■ Lp-AICIPc+AF (0,75 mM), □ Lp-AICIPc+AF (1,0 mM), □ Lp-AF.

A formulação lipossomal proposta apresentou-se estável durante 75 dias, e após esse período houve desestabilização com o aparecimento de agregados.

4.5 Quantificação da AlClPc nanoestruturada nas formulações lipossomais

Após a destruição das vesículas lipossomais, os lipossomas Lp-AlClPc e Lp-AlClPc+AF foram analisados por espectroscopia de fluorescência, como descrito no item 2.4. Os estudos foram realizados em triplicata. Na tabela 3 temos a concentração, em $\mu\text{mol/L}$, calculada para cada lipossoma.

Tabela 3 - Concentração ($\mu\text{mol/L}$) de AlClPc calculada para cada lipossoma.

Lipossoma	C ($\mu\text{mol/L}$)
Lp-AlClPc	$1,09 \pm 0,07$
Lp-AlClPc+AF (0,5 mM)	$1,12 \pm 0,04$

A concentração encontrada foi de aproximadamente 1 $\mu\text{mol/L}$ para ambos os lipossomas, Lp-AlClPc e Lp-AlClPc+AF, não havendo, portanto, uma diferença de concentração significativa estatisticamente. Sendo assim, o ácido fólico não altera a internalização do FF, mais um indicativo de que, a estrutura do lipossoma mantém-se semelhante mesmo com o aditivo, possibilitando o uso como vetorizador, que visa proporcionar maior absorção do FF pelo tecido alvo.

4.6 Cultivo e expansão da linhagem celular de adenocarcinoma de mama humano (MCF7)

Foi necessário o estudo de diferentes meios de cultura até encontrarmos o meio ideal ao cultivo celular desta linhagem, já que as células não responderam bem ao meio descrito pelo catálogo da ATCC[®]. Os meios utilizados foram detalhados na tabela 4.

Tabela 4 - Composição dos meios de cultura testados para cultivo das células MCF7.

Meio	Suplemento/100 mL				
	SFB (10%)	Antibiótico (1mL)	Anfotericina (250 µL)	Aminoácido (1 mL)	Insulina (1 mg)
(I) EMEM	X				x
(II) DMEM	X	x	x		x
(III) DMEM	X	x	x	x	x
(IV) DMEM	X	x	x	x	

Com a adequação do meio de cultura, foi possível aumentar e padronizar o tempo de confluência da linhagem celular, tabela 5.

Tabela 5 - Tempo de confluência para a linhagem celular MCF7 em função do meio de cultura utilizado no estudo.

Meio	Tempo de confluência
I	15 dias
II	5 dias
III	5 dias
IV	3 dias

As células MCF7 formam agregados na garrafa de cultura e crescem em suspensão até a terceira passagem, após a terceira tripsinização passam a crescer quase totalmente aderidas na garrafa de cultura. A linhagem apresentou a morfologia correta e desenvolveu-se bem, possibilitando os ensaios *in vitro*. A Figura 11 mostra o desenvolvimento das células na terceira passagem, ao atingirem confluência.

Figura 11 - Células MCF7 durante a terceira passagem, ao atingirem confluência com aumento de 10 vezes.

4.7 Ensaios de citotoxicidade

É importante determinar a citotoxicidade das formulações a fim de se avaliar a biocompatibilidade e a faixa de concentração que deverá ser utilizada, visando-se encontrar um intervalo de segurança no qual o alvo seja atingido, minimizando os danos às células sadias.

O ensaio de MTT baseia-se na detecção do crescimento e morte celular, de acordo com a capacidade mitocondrial em converter o sal de tetrazolio, MTT, em um metabólito de coloração roxa, o formazan, que pode ser detectado espectrofotometricamente com absorção em 560 nm. A estratégia da técnica depende da atividade mitocondrial das células vivas, que está diretamente relacionada com o metabolismo que resulta na produção do formazan.

A significância estatística das diferenças entre os resultados obtidos foi determinada pelo teste de análise de variância One-way ANOVA seguido do pós-teste Tukey t-test para múltiplas comparações (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$).

As figuras 6 e 7 mostram a viabilidade celular obtida para o FF livre e o ácido fólico livre, respectivamente. Na figura 8 temos a viabilidade celular para o lipossoma contendo somente o FF, e na figura 9 para o lipossoma contendo o FF e ácido fólico.

O FF livre, AIClPc, apresentou citotoxicidade elevada em concentrações maiores que 0,5 $\mu\text{mol/L}$, com a viabilidade celular menor que 60%, o que, juntamente com a hidrofobicidade que prejudica a administração em meios biológicos, evidencia a necessidade de um sistema de liberação de fármaco, o lipossoma neste caso, para evitar dano aos tecidos vizinhos ao alvo.

Figura 12 - Ensaio in vitro de citotoxicidade da AIClPc (de 0,5 a 8,7 $\mu\text{mol/L}$) livre em células MCF7. Sendo que CT = controle; DMSO = dimetilsulfóxido, solvente utilizado para a diluição do fármaco. Com significância estatística * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação ao controle.

Figura 13 - Ensaio in vitro de citotoxicidade do ácido fólico (de 2 a 500 µmol/L) livre em células MCF7. Sendo que CT = controle. Sem significância estatística em relação ao controle.

O ácido fólico livre não apresentou citotoxicidade significativa às células MCF7, mantendo a viabilidade celular em torno de 100%, percentual do controle, evidenciando sua biocompatibilidade. Esse é um dado muito importante considerando-se que se propõem o uso do ácido fólico nas formulações somente como agente vetorizador.

Figura 14 - Ensaio in vitro de citotoxicidade do lipossoma contendo somente AIClPc (0,06 a 0,5 µmol/L) em células MCF7. Sendo que CT = controle. Sem significância estatística em relação ao controle.

Figura 15 - Ensaio in vitro de citotoxicidade do lipossoma contendo AIClPc (0,02 a 0,5 $\mu\text{mol/L}$) e ácido fólico (com concentração variando entre 31,25 e 250,0 $\mu\text{mol/L}$) em células MCF7. Sendo que CT = controle. Sem significância estatística em relação ao controle.

Na figura 15, o gráfico da viabilidade celular foi construído em função do FF, pois esse é o ativo que desencadeará os processos fotobiológicos com a aplicação de luz, levando à morte celular e, como mostrado pela figura 13, o ácido fólico livre não apresenta citotoxicidade nas condições aplicadas.

As formulações lipossomais se mostraram biocompatíveis, apresentando viabilidade celular em torno de 100%. A biocompatibilidade, aliada a uma biodistribuição adequada levam a resultados que favorecem o emprego destes processos em protocolos *in vivo*. Uma baixa citotoxicidade está diretamente relacionada à redução de efeitos colaterais ocasionados após a administração sistêmica, tópica ou transdérmica de formulações (PRIMO, F. L., 2009).

4.8 Ensaios de Fototoxicidade

Com base nos estudos de citotoxicidade, puderam ser estabelecidas as condições de trabalho para a aplicação da TFD. Tendo em vista que a maior concentração de FF lipossomal utilizada não apresentou toxicidade no escuro, o que é condição essencial para a continuidade,

e que essa mesma concentração já demonstrou boa resposta à TFD (BARBUGLI et al., 2010), adotou-se a concentração fixa de 0,5 $\mu\text{mol/L}$ de AlClPc para os ensaios com fotoestímulo.

Foram aplicadas diferentes doses de laser, sempre operando com o comprimento de onda em 670 nm e com 100 mW de potência, e então a viabilidade celular foi analisada seguindo o teste de MTT e tratamento estatístico descrito anteriormente (item 4.7).

No caso da AlClPc livre, pôde-se observar que a porcentagem de viabilidade celular, quando aplicada a dose de 100 mJ/cm^2 ficou em torno de 62% e com a dose maior, 150 mJ/cm^2 , foi de 15% aproximadamente, figura 16.

Figura 16 - Porcentagem de células MCF7 viáveis após 3 horas de incubação com AlClPc livre, após irradiação com laser. Significância estatística * $p < 0,05$ em relação ao controle.

Na figura 17, podemos ver que quando tratadas com AlClPc lipossomal e submetidas à irradiação de 100 mJ/cm^2 , ocorre cerca de 45% de morte das células MCF7, já com a dose de 150 mJ/cm^2 a morte celular chega a 98%. Resultado muito parecido, é observado para o lipossoma de AlClPc contendo ácido fólico – Lp-AlClPc+AF (0,5 mM), sendo que ocorreu morte de 47% das células, com a menor dose de luz e de 94% das células com a dose maior, figura 18.

Figura 17 - Porcentagem de células MCF7 viáveis após 3 horas de incubação com Lp-AIClPc, após irradiação com laser. Significância estatística * $p < 0,05$ em relação ao controle.

Figura 18 - Porcentagem de células MCF7 viáveis após 3 horas de incubação com Lp-AIClPc+AF (0,5 mM), após irradiação com laser. Significância estatística * $p < 0,05$ em relação ao controle.

Foram realizados também ensaios de fototoxicidade com as formulações que não continham o FF, com a maior dose de luz utilizada nos estudos anteriores (150 mJ/cm²) a fim de se avaliar se seus componentes apresentavam propriedades fotooxidativas. A figura 19 nos mostra que não houve diferença estatística significativa em relação ao controle, com a viabilidade celular mantendo-se próxima a 100% em ambos os casos.

Figura 19 - Porcentagem de células MCF7 viáveis após 3 horas de incubação com Lp-VZ e Lp-AF, após irradiação com laser. Significância estatística * $p < 0,05$ em relação ao controle.

A alta taxa de morte das células de câncer metastático apresentada com a aplicação de luz laser é um excelente resultado e comprova a eficiência da AICIPc como fármaco fotossensibilizante, o que corrobora com outros resultados apresentados em estudos prévios (SIQUEIRA-MOURA et al., 2013) e mostrando-se até mesmo mais eficaz para a dose de 150 mJ/cm^2 que em alguns casos (BARBUGLI et al., 2010; DE PAULA et al., 2013). Os efeitos puderam ser observados após 3 horas de incubação, portanto, há uma boa internalização das formulações nas células. Além disso, a morte celular é mais acentuada no caso da AICIPc lipossomal, evidenciando a entrega mais eficiente do FF ao meio intracelular, como esperado.

Deste modo, os lipossomas estudados se enquadram nas características esperadas para a aplicação em TFD, como descrito no item 1.2, apresentando resultados muito satisfatórios. Considerando-se os resultados apresentados até o presente momento e para tentar entender melhor a interação do lipossoma com as células, foram realizados estudos de internalização celular.

4.9 Internalização Celular

A. *Microscopia Confocal*

Foram escolhidas as células HaCat para os estudos de comparação com as células MCF7, pois em tecidos saudáveis o receptor folato é expressado em células epiteliais (KELLEY , ROWAN e RATNAM, 2003), em concentrações menores que quando comparados as células neoplásicas, em especial no caso de células mamárias.

As imagens obtidas por microscopia confocal para as células MCF7 (figura 20) e HaCat (figura 21) mostram o perfil de distribuição intracelular do fármaco. É possível observar que a AlClPc (em vermelho) se acumula preferencialmente no citoplasma celular.

Figura 20 - Fotos de microscopia confocal de células MCF7 incubadas com (I) AlClPc livre, (II) Lp-AlClPc e (III) Lp-AlClPc+AF (0,5 μ M). Na primeira coluna, a coloração azul mostra o núcleo celular, corado com DAPI; na segunda coluna a coloração vermelha é resultado da emissão de fluorescência da AlClPc intracelular e na terceira coluna as imagens estão sobrepostas.

Figura 21- Fotos de microscopia confocal de células HaCat incubadas com (I) AlClPc livre, (II) Lp-AlClPc e (III) Lp-AlClPc+AF (0,5 μ M). Na primeira coluna, a coloração azul mostra o núcleo celular, corado com DAPI; na segunda coluna a coloração vermelha é resultado da emissão de fluorescência da AlClPc intracelular e na terceira coluna as imagens estão sobrepostas.

Em ambos os casos (MCF7 e HaCat) é possível notar que o FF encontra-se distribuído no citoplasma. A incorporação da AlClPc no citoplasma está de acordo com a característica de FF de se acumularem preferencialmente em organelas como os lisossomos e mitocôndria, por exemplo (BARBUGLI, P. A., 2010). Esse resultado corrobora também com o perfil de internalização celular proposto para lipossomas, no qual os lipossomas são endocitados

sofrem a ação dos lisossomos e ocorre a liberação do fármaco (DUZGUNES e NIR, 1999; RADWAN ALMOFTI et al., 2003; SIMÕES et al., 2001).

É possível notar, na figura 20, que na região indicada pela seta na, imagem I, o FF parece estar também circundando o citoplasma. Esse fato indica que não ocorreu a internalização total e evidencia que os lipossomas (imagens II e III) facilitam a entrega do fármaco no meio intracelular em células cancerosas, como esperado.

B. Emissão de Fluorescência da AlClPc Intracelular em sistema Safira

Através da emissão de fluorescência da AlClPc, foi possível avaliar a diferença de internalização entre as formulações lipossomais. Constatou-se que o ácido fólico, quando adicionado ao sistema lipossomal de AlClPc, favorece a entrega do fármaco ao meio intracelular.

Figura 22- Espectros de emissão de fluorescência do ■ controle (CT*), do ■ Lp-AlClPc intracelular e do ■ Lp-AlClPc-AF (0,5 mM) intracelular, em células MCF7 (linha contínua) e células HaCat (linha tracejada).

Figura 23 - Porcentagem de formulação internalizada em células MCF7 e HaCat após 3 horas de incubação. Sendo que corresponde ao Lp-AIClPc e corresponde ao Lp-AIClPc+AF. Significância estatística * $p < 0,05$ em relação ao controle.

As figuras 22 e 23 evidenciam que, utilizando o ácido como aditivo foi possível aumentar a internalização do FF veiculado. Foi observado que a entrega do ativo ao meio intracelular foi cerca de 20 % nas células de câncer de mama. Notou-se também que para as duas formulações lipossomais, Lp-AIClPc e Lp-AIClPc+AF (0,5 mM), houve maior entrega nas células cancerosas (MCF7) que nas células saudáveis (HaCat).

Como dito anteriormente, a principal via de entrada no lipossoma é através de endocitose. Para que isso seja possível deve haver a ligação entre um ligante e um receptor presente na membrana, com subsequente dobragem para dentro da membrana da célula para formar uma vesícula intracelular denominada endossoma, que será liberado no citoplasma (LEAMON e LOW, 1992). Essa endocitose pode tornar-se mais atraente quando há um receptor específico, como é o caso do receptor folato.

A via principal para a entrada de derivados de folato nas células é através de transporte facilitado por uma proteína de transporte de membrana, o transportador de folato reduzido (KE, MATHIAS e GREEN, 2003), que possui expressão elevada em células de cânceres humanos (SUDIMACK e LEE, 2000). É possível, portanto, explicar a maior internalização do

FF nas células MCF7, principalmente quando se faz uso de ácido fólico. Sendo assim, o ácido fólico é um aditivo eficiente para a vetorização do sistema lipossomal de AlClPc estudado.

5. CONCLUSÃO

O objetivo principal desse trabalho foi demonstrar que a associação de ácido fólico ao sistema lipossomal de AlClPc leva a uma maior internalização do mesmo na célula de câncer de mama, onde há super expressão de receptor folato.

As formulações lipossomais propostas, contendo ácido fólico como vetorizador e AlClPc como fármaco fotossensibilizante, apresentaram diâmetro médio de partículas dentro da escala nanométrica, com tamanho inferior a 200 nm, o que aumenta o tempo de circulação do fármaco no organismo e facilita a internalização celular. Possuem índice de polidispersão baixo, evidenciando que o lipossoma é homogêneo, ou seja, apresenta vesículas com tamanhos similares. São estáveis durante 2 meses e meio com estocagem em temperatura ambiente (25°C), mantendo o tamanho e IPd muito próximos durante todo o período. Além disso, a veiculação do FF utilizado (AlClPc) em lipossoma não alterou suas características fotoquímicas e fotoquímicas.

Verificou-se que as formulações possuem uma biocompatibilidade adequada permitindo sua aplicação em TFD, já que é essencial que o FF não possua citotoxicidade na ausência de fotoestímulo luminoso, diminuindo assim efeitos colaterais indesejados. Com a aplicação de laser, com dose de 150 mJ/cm², no comprimento de onda de absorção do FF, observou-se altos níveis de morte celular, chegando a 98% comprovando a eficácia do sistema lipossomal de AlClPc.

O acúmulo preferencial da AlClPc no citoplasma da célula está de acordo com o esperado para FF, isto é, não se observou acúmulo no núcleo e consequente intercalação com ácidos nucleicos, sinalizando que não há efeito mutagênico secundário, ideal para o protocolo com TFD.

Os testes realizados com célula de adenocarcinoma de mama (MCF7) e queratinócitos humanos (HaCat) mostraram que há maior internalização dos lipossomas desenvolvidos em

células cancerosas, diminuindo o risco de bioacumulação e citotoxicidade em células saudáveis de tecidos vizinhos ao tecido lesionado. A presença de ácido fólico como aditivo aumenta a concentração do FF no meio intracelular, principalmente no caso da MCF7 confirmando a premissa de que o ácido fólico age como vetorizador do veículo lipossomal em células de câncer de mama, favorecendo a entrega do ativo no sítio alvo.

Esses resultados demonstraram a obtenção de um novo sistema lipossomal eficiente que contém AlClPc como ativo e ácido fólico como agente vetorizador, agregando as vantagens da nanotecnologia com a aplicação em TFD com baixas doses de luz. Tal sistema possibilita a veiculação de FF para tratamento *in vitro* de câncer de mama conforme os ensaios biológicos apresentados, permitindo que novos protocolos sejam desenvolvidos para estudos posteriores, *in vivo*.

Portanto, a ação sinérgica observada na linhagem celular MCF7 em relação às células normais mostra que o ácido fólico apresentou o resultado esperado e aumentou a internalização do ativo somente nas células cancerosas. Além disso, este é o primeiro trabalho que envolve o uso de ácido fólico como aditivo em sistemas lipossomais para aumentar a interação sitio-específica em células de câncer de mama em conjunto com a TFD.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINIS, P.; BERG, K.; CENGEL, K. A.; FOSTER, T. H.; GIROTTI, A. W.; GOLLNICK, S. O.; HAHN, S. M.; HAMBLIN, M. R.; JUZENIENE, A.; KESSEL, D.; KORBELIK, M.; MOAN, J.; MROZ, P.; NOWIS, D.; PIETTE, J.; WILSON, B. C.; GOLAB, J. Photodynamic Therapy of Cancer: An Update, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 61, p. 250-281, 2011.
- ALLISON, R. R.; MOGHISSI, K. Oncologic photodynamic therapy: Clinical strategies that modulate mechanisms of action, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2013.
- ALLISON, R.; DOWNIE, G.; CUENCA, R.; HU, X.-H.; CHILDS, C. J.; SIBATA, C. H. *Photosensitizers in clinical PDT*, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 1, p. 27-42, 2004.
- ARTANDI, S. E.; DEPINHO, R. A. A critical role for telomeres in suppressing and facilitating carcinogenesis, *Current Opinion in Genetics & Development*, v. 10, p. 39-46, 2000.
- ARTANDI, S. E.; DEPINHO, R. A. Telomeres and telomerase in cancer, *Carcinogenesis*, v. 31, p. 9-18, 2010.
- ASAI, T. Nanoparticle-Mediated Delivery of Anticancer Agents to Tumor Angiogenic Vessels, *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 35, p. 1855-1861, 2012.
- BARBUGLI, P. A. **Estudo dos efeitos da terapia fotodinâmica na progressão tumoral e em modelos celulares tridimensionais**. 2010. Tese (Doutorado em Medicamentos e Cosméticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.
- BARBUGLI, P. A.; SIQUEIRA-MOURA, M. P.; ESPREAFICO, E. M.; TEDESCO, A. C. In Vitro Phototoxicity of Liposomes and Nanocapsules Containing Chloroaluminum Phthalocyanine on Human Melanoma Cell Line, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 10, p. 569-573, 2010.
- BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B. d.; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte, *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 43, p. 167-179, 2007.
- BICALHO, L. S.; LONGO, J. P.; CAVALCANTI, C. E. O.; SIMIONI, A. R.; BOCCA, A.; DE ALMEIDA SANTOS, M.; TEDESCO, A. C.; AZEVEDO, R. B. Photodynamic Therapy Leads to Complete Remission of Tongue Tumors and Inhibits Metastases to Regional Lymph Nodes, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 9, p. 811-818, 2013.
- BOLFARINI, G. C.; SIQUEIRA-MOURA, M. P.; DEMETS, G. J. F.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C. In vitro evaluation of combined hyperthermia and photodynamic effects using magnetoliposomes loaded with cucurbituril zinc phthalocyanine complex

- on melanoma, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 115, p. 1-4, 2012.
- BONNETT, R. *Chemical Aspects of Photodynamic Therapy - Chlorins and Bacteriochlorins*. In: ADVANCED CHEMISTRY TEXTS. **Chemical Aspects of Photodynamic Therapy**. London: Gordon and Breach Science Publishers, 2000. Capítulo 9, p. 176-197.
- BONNETT, R. e. a. Photophysical properties of 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)-porphyrin (m-THPP), 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)chlorin (m-THPC) and 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)bacterio-chlorin (m-THPBC): a comparative study, *Journal of the Chemical Society*, v. 2, p. 325-328, 1998.
- CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part two-cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 2, p. 1-23, 2005.
- CHO, K.; WANG, X.; NIE, S.; CHEN, Z.; SHIN, D. M. Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer, *Clinical Cancer Research*, v. 14, p. 1310-1316, 2008.
- DE PAULA, C.; TEDESCO, A.; PRIMO, F.; VILELA, J.; ANDRADE, M.; MOSQUEIRA, V. Chloroaluminium phthalocyanine polymeric nanoparticles as photosensitisers: Photophysical and physicochemical characterisation, release and phototoxicity in vitro, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 49, p. 371-381, 2013.
- DE PAULA, L. B.; PRIMO, F. L.; JARDIM, D. R.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C. Development, characterization, and in vitro trials of chloroaluminum phthalocyanine-magnetic nanoemulsion to hyperthermia and photodynamic therapies on glioblastoma as a biological model, *Journal of Applied Physics*, v. 111, 2012.
- DE ROSA, F. S.; TEDESCO, A. C.; LOPEZ, R. F. V.; RIEMMA PIERRE, M. B.; LANGE, N.; MARCHETTI, J. M.; GOMES ROTTA, J. C.; LOPES BADRA BENTLEY, M. V. In vitro skin permeation and retention of 5-aminolevulinic acid ester derivatives for photodynamic therapy, *Journal of Controlled Release*, v. 89, p. 261-269, 2003.
- DOUGHERTY, T.; GOMER, C.; ANDRESON, B.; JORI, G.; KESSEL, D.; KORBELIK, J.; PENG, Q. Photodynamic Therapy, *Journal of the National Cancer Institute*, v. 90, p. 889-905, 1998.
- DUZGUNES, N.; NIR, S. Mechanisms and kinetics of liposome-cell interactions, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 40, p. 3-18, 1999.
- FAN, Y.; LIU, J.; WANG, D.; SONG, X.; HU, Y.; ZHANG, C.; ZHAO, X.; NGUYEN, T. L. The preparation optimization and immune effect of epimedium polysaccharide-propolis flavone liposome, *Carbohydrate Polymers*, v. 94, p. 24-30, 2013.
- FERREIRA, L. F. V.; LEMOS, M. J.; WINTGENS, V.; NETTO-FERREIRA, J. C. A técnica da reflectância difusa aplicada ao estudo da fluorescência de 2,3-naftalimidaz n-substituídas com grupos alquila incluídas em b-ciclodextrina e adsorvidas em celulose microcristalina, *Química Nova*, v. 22, p. 522-528, 1999.
- FOOTE, C. Definition of type I and II photosensitized oxidation, *Photochemistry and Photobiology*, v. 54, 1991.

- GALLEGO-GOMEZ, F.; QUINTANA, J. A.; VILLALVILLA, J. M.; DIAZ-GARCIA, M. A.; MARTIN-GOMIS, L.; FERNANDEZ-LAZARO, F.; SASTRE-SANTOS, A. Phthalocyanines as Efficient Sensitizers in Low-T(g) Hole-Conducting Photorefractive Polymer Composites, *Chemistry of Materials*, v. 21, p. 2714-2720, 2009.
- GILLEY, D.; TANAKA, H.; HERBERT, B. S. Telomere dysfunction in aging and cancer, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 37, p. 1000-1013, 2005.
- HAYASHI, K.; SHIMANOUCHI, T.; KATO, K.; MIYAZAKI, T.; NAKAMURA, A.; UMAKOSHI, H. Span 80 vesicles have a more fluid, flexible and "wet" surface than phospholipid liposomes, *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, v. 87, p. 28-35, 2011.
- HOEBEKE, M. *The importance of liposomes as models and tools in the understanding of photosensitization mechanisms*, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 28, p. 189-196, 1995.
- INCA, Instituto Nacional do Câncer, tipos de câncer - Mama. Brasil, 2013. Disponível em < http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/cancer_ma+ma++>. Acesso em: 01 jul. 2013.
- JACKSON, J. K.; PIRMORADI, F. N.; WAN, C. P. L.; SIU, T.; CHIAO, M.; BURT, H. M. Increased accumulation of paclitaxel and doxorubicin in proliferating capillary cells and prostate cancer cells following ultrasound exposure, *Ultrasonics*, v. 51, p. 932-939, 2011.
- JORI, G. *Tumour photosensitizers: approaches to enhance the selectivity and efficiency of photodynamic therapy*, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 36, p. 87-93, 1996.
- KANNAN, N.; HUDA, N.; TU, L.; DROUMEVA, R.; AUBERT, G.; CHAVEZ, E.; BRINKMAN, R.; LANSDORP, P.; EMERMAN, J.; ABE, S.; EAVES, C.; GILLEY, D. The Luminal Progenitor Compartment of the Normal Human Mammary Gland Constitutes a Unique Site of Telomere Dysfunction, *Stem Cell Reports*, v. 1, p. 28-37, 2013.
- KAWASE, Y.; ISEKI, H. Parameter-finding studies of photodynamic therapy for approval in Japan and the USA, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2013.
- KAYE, S.; RICHARDSON, V. *Potential of liposomes as drug carriers in cancer chemotherapy: a review*, *Cancer Chemotherapy Pharmacological*, v. 3, p. 81-85, 1979.
- KE, C. Y.; MATHIAS, C. J.; GREEN, M. A. The folate receptor as a molecular target for tumor-selective radionuclide delivery, *Nuclear Medicine and Biology*, v. 30, p. 811-817, 2003.
- KELLEY, K. M.; ROWAN, B. G.; RATNAM, M. Modulation of the folate receptor alpha gene by the estrogen receptor: mechanism and implications in tumor targeting, *Cancer research*, v. 63, p. 2820-2828, 2003.

- LAOUINI, A.; JAAFAR-MAALEJ, C.; SFAR, S.; CHARCOSSET, C.; FESSI, H. Liposome preparation using a hollow fiber membrane contactor-Application to spironolactone encapsulation, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 415, p. 53-61, 2011.
- LEAMON, C. P.; LOW, P. S. Cytotoxicity of momordin-folate conjugates in cultured human cells, *The Journal of Biological Chemistry*, v. 267, p. 24966-24971, 1992.
- LIANG, C. Y.; YANG, Y. B.; LING, Y.; HUANG, Y. S.; LI, T.; LI, X. M. Improved therapeutic effect of folate-decorated PLGA-PEG nanoparticles for endometrial carcinoma, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 19, p. 4057-4066, 2011.
- LIU, Y. T.; LI, K.; PAN, J.; LIU, B.; FENG, S. S. Folic acid conjugated nanoparticles of mixed lipid monolayer shell and biodegradable polymer core for targeted delivery of Docetaxel, *Biomaterials*, v. 31, p. 330-338, 2010.
- LONDON, E. Lipid Bilayer Structure. In: EDITORS-IN-CHIEF: WILLIAM, J. L., LANE, M. D. **Encyclopedia of Biological Chemistry**. Waltham: Academic Press, 2013. p. 733-735.
- LONGO, J. P. F.; LEAL, S. C.; SIMIONI, A. R.; ALMEIDA-SANTOS, M. D. M.; TEDESCO, A. C.; AZEVEDO, R. B. Photodynamic therapy disinfection of carious tissue mediated by aluminum-chloride-phthalocyanine entrapped in cationic liposomes: an in vitro and clinical study, *Lasers in Medical Science*, v. 27, p. 575-584, 2012.
- LUCOCK, M. Folic acid: Nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes, *Molecular Genetics and Metabolism*, v. 71, p. 121-138, 2000.
- MACAROFF, P. P.; PRIMO, F. L.; DE AZEVEDO, R. B.; LACAVA, Z. G. M.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C. Synthesis and characterization of a magnetic nanoemulsion as a promising candidate for cancer treatment, *Ieee Transactions on Magnetism*, v. 42, p. 3596-3598, 2006.
- MAHERANI, B.; ARAB-TEHRANY, E.; KHEIROLOMOOM, A.; CLEYMAND, F.; LINDER, M. Influence of lipid composition on physicochemical properties of nanoliposomes encapsulating natural dipeptide antioxidant l-carnosine, *Food Chemistry*, v. 134, p. 632-640, 2012.
- Ministério da Saúde; INCA. **ABC do Câncer: Abordagens Básicas para o Controle do Câncer**. Brasil, 2011. Disponível em: < http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/abc_do_cancer.pdf>. Acesso em: 01 jul. 2013.
- NUNES, S. M. T. S. F. S. T. A. C. Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminium phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives., *Brazilian Journal of Medical and Biology Research* 2004.
- OLEINICK, N.; EVANS, H. *The photobiology of photodynamic therapy: cellular targets and mechanisms*, *Radiation Research*, v. 150, p. 146-150, 1998.
- ONER, N.; VATANSEVER, U.; KARASALIHOGU, S.; EKUKLU, G.; SÇELTIK, C.; BİNER, B. The prevalence of folic acid deficiency among adolescent girls living in Edirne, Turkey, *Journal of Adolescent Health*, v. 38, p. 599-606, 2006.

- PASZKO, E.; EHRHARDTB, C.; SENGE, M. O.; KELLEHER, D. P.; REYNOLDS, J. V. Nanodrug applications in photodynamic therapy, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2010.
- PENG, C. Y.; ZHANG, Y. Y.; TONG, W. J.; GAO, C. Y. Influence of Folate Conjugation on the Cellular Uptake Degree of Poly(allylamine hydrochloride) Microcapsules, *Journal of Applied Polymer Science*, v. 121, p. 3710-3716, 2011.
- PEPLOW, P. V.; CHUNG, T. Y.; BAXTER, G. D. Photodynamic Modulation of Wound Healing: A Review of Human and Animal Studies, *Photomedicine and Laser Surgery*, v. 30, p. 118-148, 2012.
- PLAETZER, K.; KRAMMER, B.; BERLANDA, J.; BERR, F.; KIESSLICH, T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects, *Lasers in Medical Science*, v. 24, p. 259-268, 2009.
- PRIMO, F. L. **Processos fotodinâmicos para bioestimulação tecidual em modelo *in vitro* de pele humana empregando-se laser de baixa potência e cloro alumínio ftalocianina em nanoemulsão.** 2009. 195 f. Tese (Doutorado em Medicamentos e Cosméticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.
- PRIMO, F. L.; BENTLEY, M. V. L. B.; TEDESCO, A. C. Photophysical studies and in vitro skin permeation/retention of Foscan (R)/nanoemulsion (NE) applicable to photodynamic therapy skin cancer treatment, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 8, p. 340-347, 2008.
- PRIMO, F. L.; RODRIGUES, M. M. A.; SIMIONI, A. R.; BENTLEY, M. V. L. B.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C. In vitro studies of cutaneous retention of magnetic nanoemulsion loaded with zinc phthalocyanine for synergic use in skin cancer treatment, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 320, p. E211-E214, 2008.
- PRIMO, F. L.; SIQUEIRA-MOURA, M. P.; SIMIONI, A. R.; PETI, A. P. F.; TEDESCO, A. C. Preparation, characterization and cytotoxicity assays of chloroaluminum phthalocyanine photosensitizer drug loaded in PLGA-nanocapsules, *Drugs of the Future*, v. 32, p. 74, 2007.
- RADWAN ALMOFTI, M.; HARASHIMA, H.; SHINOHARA, Y.; ALMOFTI, A.; BABA, Y.; KIWADA, H. Cationic liposome-mediated gene delivery: Biophysical study and mechanism of internalization, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 410, p. 246-253, 2003.
- ROCHA, M. S. T.; LUCCI, C. M.; LONGO, J. P. F.; GALERA, P. D.; SIMIONI, A. R.; LACAVA, Z. G. M.; TEDESCO, A. C.; AZEVEDO, R. B. Aluminum-Chloride-Phthalocyanine Encapsulated in Liposomes: Activity Against Naturally Occurring Dog Breast Cancer Cells, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 8, p. 251-257, 2012.
- SIMIONI, A. R.; PELISSON, M. M. M.; BELTRAME JR, M.; TEDESCO, A. C. Photophysical and Photobiological Studies of a Silicon Tribenzonaphthoporphyrizinato Incorporated into Liposomes for Photodynamic

- Therapy Use, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 8, p. 3208-3215, 2008.
- SIMIONI, A. R.; PRIMO, F. L.; RODRIGUES, M. M. A.; LACAVAL, Z. G. M.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C. Preparation, characterization and in vitro toxicity test of magnetic nanoparticle-based drug delivery system to hyperthermia of biological tissues, *Ieee Transactions on Magnetics*, v. 43, p. 2459-2461, 2007.
- SIMIONI, A. R.; RODRIGUES, M. M. A.; PRIMO, F. L.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C. Effect of Diode-Laser and AC Magnetic Field of Bovine Serum Albumin Nanospheres Loaded with Phthalocyanine and Magnetic Particles, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 11, p. 3604-3608, 2011.
- SIMÕES, S.; SLEPUSHKIN, V.; DUZGUNES, N.; PEDROSO DE LIMA, M. C. On the mechanisms of internalization and intracellular delivery mediated by pH-sensitive liposomes, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v. 1515, p. 23-37, 2001.
- SIQUEIRA-MOURA, M. P.; PRIMO, F. L.; PETI, A. P. F.; TEDESCO, A. C. Validated spectrophotometric and spectrofluorimetric methods for determination of chloroaluminum phthalocyanine in nanocarriers, *Pharmazie*, v. 65, p. 9-14, 2010.
- SIQUEIRA-MOURA, M. P.; PRIMO, F. L.; ESPREAFICO, E. M.; TEDESCO, A. C. Development, characterization, and photocytotoxicity assessment on human melanoma of chloroaluminum phthalocyanine nanocapsules, *Materials Science and Engineering: C*, v. 33, p. 1744-1752, 2013.
- SMITH, A. D. Folic acid fortification: the good, the bad, and the puzzle of vitamin B-12, *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 85, p. 3-5, 2007.
- STERNBERG, E.; DOLPHIN, D.; BRUCKNER, C. Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy, *Tetrahedron*, v. 54, p. 4151, 1998.
- SUDIMACK, J.; LEE, R. J. Targeted drug delivery via the folate receptor, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 41, p. 147-162, 2000.
- TRIESSCHEIJN, M.; BAAS, P.; SCHELLENS, J. H. M.; STEWART, F. A. Photodynamic Therapy in Oncology, *The Oncologist*, v. 11, p. 1034-1044, 2006.
- VALENCIA, P. M.; HANEWICH-HOLLATZ, M. H.; GAO, W. W.; KARIM, F.; LANGER, R.; KARNIK, R.; FAROKHZAD, O. C. Effects of ligands with different water solubilities on self-assembly and properties of targeted nanoparticles, *Biomaterials*, v. 32, p. 6226-6233, 2011.
- VIOR, M. C. G.; MONTEAGUDO, E.; DICELIO, L. E.; AWRUCH, J. A comparative study of a novel lipophilic phthalocyanine incorporated into nanoemulsion formulations: Photophysics, size, solubility and thermodynamic stability, *Dyes and Pigments*, v. 91, p. 208-214, 2011.
- WANG, X.; YANG, L.; CHEN, Z.; SHIN, D. M. Application of Nanotechnology in Cancer Therapy and Imaging, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 58, p. 97-110, 2008.

- XIN, H. L.; SHA, X. Y.; JIANG, X. Y.; ZHANG, W.; CHEN, L. C.; FANG, X. L. Anti-glioblastoma efficacy and safety of paclitaxel-loading Angiopep-conjugated dual targeting PEG-PCL nanoparticles, *Biomaterials*, v. 33, p. 8167-8176, 2012.
- ZHOU, C. Mechanisms of tumor necrosis induced by photodynamic therapy, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 3, p. 299-318, 1989.
- ZHOU, D. F.; XIAO, H. H.; MENG, F. B.; ZHOU, S. Y.; GUO, J. S.; LI, X. Y.; JING, X. B.; HUANG, Y. B. Layer-by-Layer Assembled Polypeptide Capsules for Platinum-Based Pro-Drug Delivery, *Bioconjugate Chemistry*, v. 23, p. 2335-2343, 2012.